

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001819

APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的构建及其自噬流水平研究

陈婧菲, 贺桂琼, 龙志敏

(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的构建及自噬流情况。**方法:**将 CAG-mRFP-eGFP-LC3 转基因自噬流模型小鼠与 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 模型小鼠交配繁殖, 对产下的子代进行基因分型鉴定, 选出同时含有 CAG-mRFP-eGFP-LC3 基因和 APP/PS1 的小鼠为 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠, Morris 水迷宫实验检测小鼠行为学变化。取 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠各 6 只, 断头取脑后在透射电镜及荧光显微镜下观察自噬流的变化, 采用免疫组织化学法检测老年斑的形成, 用 Western blot 检测自噬标志物。**结果:**基因分型证实 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠构建成功。Morris 水迷宫显示, 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠找到平台的平均潜伏期和路程均明显增加 ($F=87.096, P=0.000; F=41.583, P=0.000$), 穿越平台的次数明显减少 (2.000 ± 0.707 vs. $4.800 \pm 0.800, t=2.622, P=0.031$)。透射电镜下观察, 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑神经元内出现更多的自噬小泡。荧光显微镜下观察, 与同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠比较, 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠海马区自噬体及自噬溶酶体数量均明显增高 (5.894 ± 0.742 vs. $14.820 \pm 3.350, t=0.017, P=0.000; 1.204 \pm 0.420$ vs. $1.840 \pm 0.559, t=3.156, P=0.005$), 大脑皮质内自噬体数量亦明显升高 (1.943 ± 0.415 vs. $10.030 \pm 4.382, t=6.364, P=0.000$), 但自噬溶酶体数量比较, 差异未见统计学意义 (0.562 ± 0.207 vs. $0.686 \pm 0.195, t=0.156, P=0.878$)。免疫组化染色结果显 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠大脑皮质及海马区域出现明显老年斑, 而同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑内未见老年斑。Western blot 结果显示: 与同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠比较, APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内 APP 蛋白明显升高 (0.294 ± 0.070 vs. $0.690 \pm 0.275, t=3.423, P=0.007$), 自噬相关蛋白 LC3、Beclin1、P62 水平均增高 (0.241 ± 0.004 vs. $0.534 \pm 0.019, t=37.170, P=0.000; 0.479 \pm 0.020$ vs. $1.180 \pm 0.255, t=6.820, P=0.000; 0.188 \pm 0.007$ vs. $0.356 \pm 0.021, t=18.850, P=0.000$), 但溶酶体膜蛋白 LAMP1 表达水平降低 (1.450 ± 0.065 vs. $0.773 \pm 0.043, t=8.705, P=0.000$)。**结论:**APP/PS1/LC3 三转基因小鼠自噬被激活, 但自噬溶酶体降解受阻, 是研究 AD 自噬流水平的理想动物模型。

【关键词】阿尔茨海默病; 自噬; 老年斑; 转基因小鼠**【中图分类号】**R749.16; Q255**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-17

Autophagy flux in the APP/PS1/LC3 triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Chen Jingfei, He Guiqiong, Long Zhimin

(Center of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a new APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice model and to study its autophagy flux activities.**Methods:** APP/PS1 double-transgenic Alzheimer's disease (AD) model mouse was breed with CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic autophagy flux model mouse, then their filial generations were identified by genotyping. Triple-transgenic mice expressing both CAG-mRFP-eGFP-LC3 gene and APP/PS1 gene were selected. Six APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice and six CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice were involved in this study, all in their sixth month. The Morris water maze was employed to test learning and memoryability. The activities of autophagy flux were observed under fluorescence microscope and transmission electron microscopy (TEM). Immunohistochemical staining was used to detect the formation of senile plaques; autophagy related proteins were measured by Western blot. **Results:** The genotyping confirmed that the APP/PS1/LC3 triple-transgenic mouse model was successfully established. Morris water maze test showed that, compared with those of CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice, the escape latency and path length of APP/PS1/LC3 triple-transgenic**作者介绍:**陈婧菲, Email: 4583404096@qq.com,

研究方向: 阿尔茨海默病。

通信作者:龙志敏, Email: zhiminlong@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (编号: 31600825, 81371221); 重庆市委基础与前沿研究计划资助项目 (编号: cst2016jcyjA0244); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1500231)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180705.0923.004.html> (2018-07-05)

mice were significantly increased ($F=87.096, P=0.000; F=41.583, P=0.000$), and the passing times were decreased (2.000 ± 0.707 vs. $4.800 \pm 0.800, t=2.622, P=0.031$). TEM revealed more autophagosomes in APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice neurons than in CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice. Compared with those of sixth month CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice, both autophagosomes and autolysosomes were increased in the same age triple-transgenic mice (5.894 ± 0.742 vs. $14.820 \pm 3.350, t=0.017, P=0.000; 1.204 \pm 0.420$ vs. $1.840 \pm 0.559, t=3.156, P=0.005$) in hippocampus area. Autophagosomes were significantly elevated in the cortex region of APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice (1.943 ± 0.415 vs. $10.030 \pm 4.382, t=6.364, P=0.000$), but showed no difference in autolysosome number (0.562 ± 0.207 vs. $0.686 \pm 0.195, t=0.156, P=0.878$). The staining showed that sixth month triple-transgenic mice had apparently senile plaques deposition in brains, while the CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice had none. Western blot showed that, compared with that of brood CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice, APP protein in the brain of APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice increased significantly (0.294 ± 0.070 vs. $0.690 \pm 0.275, t=3.423, P=0.007$). The proteins related with autophagy including LC3, Beclin1, P62 also increased in brains of APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice (0.241 ± 0.004 vs. $0.534 \pm 0.019, t=37.170, P=0.000; 0.479 \pm 0.020$ vs. $1.180 \pm 0.255, t=6.820, P=0.000; 0.188 \pm 0.007$ vs. $0.356 \pm 0.021, t=18.850, P=0.000$), but lysosome membrane protein LAMP1 decreased in APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice, compared with brood CAG-mRFP-eGFP-LC3 transgenic mice (1.450 ± 0.065 vs. $0.773 \pm 0.043, t=8.705, P=0.000$). **Conclusion:** Autophagy is induced in APP/PS1/LC3 triple-transgenic mice, and the degradation of autolysosomes is blocked, which is an ideal mice model for researching autophagy flux function in AD.

[Key words] Alzheimer's disease; autophagy; senile plaques; transgenic mice

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的典型病理学特征为脑组织内含 2 种异常聚集的不溶性纤维成分, 即大量 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 聚集所形成的神经炎性斑, 又称老年斑 (senile plaques, SP) 和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[1-2]。作为溶酶体介导的细胞自我处理系统, 自噬与清除 AD 相关异常积聚蛋白质密切相关。自噬流是近年来提出的一个新的概念, 它包含整个自噬过程, 包括自噬结构的形成、底物向溶酶体的运送以及底物的降解和大分子物质释放回细胞质的整个流程^[3-4]。自噬在 AD 的发生发展中起到“双刃剑”的作用^[5-6]。因此, 研究自噬在 AD 中的作用不能单纯静态检测自噬体水平, 更需要动态监测自噬流过程。本研究拟用自噬转基因模型小鼠与 AD 病转基因模型小鼠交配繁殖, 构建 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠, 为研究 AD 自噬流功能提供一种良好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 研究动物

雄性 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠 (APP^{swe}, PSEN1^{de9}) 购自中国医学科学院实验动物研究所, 雌性 3 月龄 CAG-mRFP-eGFP-LC3 转基因种鼠购自北京华夏凯奇生物技术有限公司, 动物饲养在 SPF 级动物房, 恒温 21 °C, 24 h 周期明暗交替照明。将 2 种小鼠合笼, 交配繁殖。待产下的后代达

3 周龄时用 PCR 法进行基因分型鉴定。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 试剂

鼠尾 DNA 提取试剂盒购自美国 Bimake 公司 (B40013)。生物素化 4G8 鼠抗单克隆抗体购自美国 Biolegend 公司 (800704)。LC3 多克隆抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司 (L7543)。琼脂糖购自美国 Hydragene 公司 (R9012HR-100G)。Beclin1 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司 (ab62557)。P62 多克隆抗体为美国 Cell Signaling 公司产品 (5144)。APP 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司 (ab32136)。 β -actin 鼠单克隆抗体购自南京钟鼎生物技术有限公司 (ABM0001-50 μ L)。组织蛋白裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司 (P0013B)。DAB 试剂盒 (碧云天, P0202)、ABC 免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔 IgG (碧云天, A0277) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗鼠 IgG (碧云天, A0286)。ECL 发光试剂 (碧云天, P0018)。其他均为国产分析纯。

1.3 基因分型

APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的鉴定: 剪子代小鼠鼠尾约 0.5 cm, 按照试剂盒 (Bimake 公司) 步骤提取基因组 DNA, 核酸蛋白测定仪测定浓度后进行 PCR 扩增, 1.5% Agrose gel 电泳检测, 紫外分析仪下观察。

PCR 扩增: 根据提供的引物扩增 APP, PS1 和 CAG (以 β -actin 为内对照)。APP 引物上游: 5'-CACCACAGAATCC-AAGTCGG-3', 下游: 5'-CTTGACGTTCTGGCCTCTTCC-3'; PS1 引物上游: 5'-CAGGTGCTATAAGGTCAT-3', 下游: 5'-ATCACAGCCAAGATGAGC-3'。反应条件: 94 °C 30 s + (94 °C 30 s + 58 °C 40 s + 72 °C 40 s) $\times$ 35 个循环 + 72 °C 10 min。CAG

引物上游:5'-GGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTG-3',下游:5'-CCGAGGCTGGAGATGGAGAAGG-3'。反应条件:94 ℃ 2 min+(94 ℃ 20 s+68 ℃ 50 s)×38 个循环+68 ℃ 30 s。APP 基因 PCR 产物长 350 bp,PS1 扩增片段长 608 bp,CAG 引物扩增大小为 736 bp。

1.4 形态学染色

分别取 6 只 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠,采用 3.5%水合氯醛将小鼠麻醉,经左心室快速灌注生理盐水 20 mL,冰上取脑,将脑平分为左右两半。一半脑提取蛋白质,另一半脑置于 4%多聚甲醛中后固定 24 h,30%蔗糖溶液常规脱水,冰冻冠状切片(厚度 10 μm)。由于 CAG-mRFP-eGFP-LC3 转基因小鼠自带红、绿荧光,可直接取脑切片,漂洗封片后在激光共聚焦荧光显微镜(Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)下观察并采图。

免疫组化染色:切片入 88%甲酸,室温下溶解老年斑中的不溶性 Aβ 10 min,PBST 漂洗,5%正常山羊血清室温封闭 30 min,加一抗 4G8(1:100,4G8 为靶向 Aβ17-24 氨基酸序列的抗体,4G8 阳性即说明有 Aβ 的沉积),4 ℃孵育过夜,PBST 漂洗,加入 ABC 混合液室温孵育 30 min,DAB 显色,封片后光镜下观察。

1.5 Western blot 检测

严格按照 Thermo scientific 公司提供的蛋白提取试剂盒说明,提取小鼠脑组织中的蛋白质,冰上操作,玻璃匀浆器匀浆至完全裂解。采用 Bradford 法测定总蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白经 100 ℃变性 10 min,而后用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,分离出的凝胶条带,用恒流 250 mA,在 4 ℃下电转 1 h,将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,5% BSA 液中室温封闭 2 h,加入兔抗 APP、LC3、Beclin 1、p62、LAMP1(浓度均为 1:1 000),4 ℃孵育过夜,洗涤后加入 HRP 标记的二抗(1:8 000)室温孵育 40 min 后,采用化学增强发光法(ECL)显色。Bio-rad 公司的 Quantity One 软件对蛋白条带进行光密度计量学分析。

1.6 行为学检测

Morris 水迷宫实验用于评估小鼠认知功能。水迷宫宫体直径 120 cm,高 30 cm,内壁涂黑,宫体内充满自来水,水中加入钛白粉,宫体内第一象限内放置一直径 14 cm 逃生平台,整个实验过程中平台相对位置保持不变。将自由活动的小鼠分别从四个象限随机放入水中,让其在逃生中寻找隐藏平台。该实验由三部分组成:①可视平台期:为期 1 d,逃生平台高于水面,记录小鼠逃避潜伏期及游离距离。若找到平台,则在平台上停留 10 s;若 90 s 内未找到平台,由实验者将其引至平台,并在平台上停留 10 s 后进行下一象限的训练。②定位航行实验:为期 5 d,逃生平台位于水面下 1 cm 处,记录小鼠找到水下平台的逃避潜伏期和游离距离。③空间探索实验:第 7 天,撤去水下平台,记录 60 s 内小鼠穿越平台所在位置的次数。整个实验过程小鼠常规饲养,自由饮食。Morris 水迷宫宫体内的水隔日更换,以保障清洁。

1.7 透射电镜

给予小鼠 3 mL/kg 的 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉,左心室内灌注预冷生理盐水至肝脏发白,快速剥离全脑置于冰上,分离海马 CA1 区,取约 1 mm×1 mm×1 mm 组织块,置于 3%戊二醛/1.5%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(pH7.2)缓冲液内固定,4 ℃固定 2 h 以上。随后磷酸缓冲液(pH7.2)冲洗,1%锇酸室温固定 2 h。双蒸水冲洗。梯度丙酮(50%→70%→80%→90%→100%)脱水。环氧树脂与丙酮渗透。纯树脂包埋聚合。修块、切片,甲苯胺蓝染色 2 min,光镜下定位观察。2%醋酸双氧铀染色、洗净,待铜网干燥无水后,2%柠檬酸铅染色 5~7 min,蒸馏水冲洗干净,透射电镜(JEOL JEM-1400PLUS)下观察。

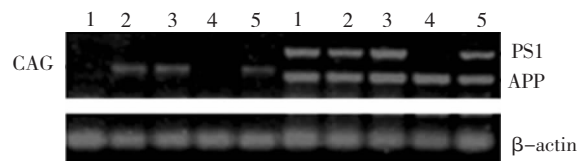
1.8 统计方法

应用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料采用两独立样本 *t* 检验;重复测量数据采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的鉴定

雌性和雄性的种鼠产下后代,剪鼠尾提取基因组 DNA 经 PCR 扩增后,1.5%琼脂糖电泳,同时出现 APP、PS1、CAG 条带的即为 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠。60 只新生小鼠中,有 20 只 APP/PS1/LC3 三转基因阳性小鼠,交配繁殖后阳性率为 33.33%。



1 为 APP/PS1 双转基因小鼠,2、3、5 为 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠,4 为 APP 单转基因小鼠

图 1 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的基因分型

2.2 学习和记忆能力的检测

Morris 水迷宫显示,6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠在可视平台实验中的逃避潜伏期和游离距离与同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠没有明显差异(52.223 ± 13.152 vs. 34.297 ± 7.774 , $t=1.173$, $P=0.274$; $F=2.863$, $P=0.333$; $10\ 807.699 \pm 2\ 094.430$ vs. $6\ 941.236 \pm 1\ 299.865$, $t=1.569$, $P=0.155$; $F=2.596$, $P=0.378$)。定位航行实验中,APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的平均逃避潜伏期均明显长于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠(组间差异: $F=87.096$, $P=0.000$; 时间差异: $F=0.955$, $P=0.504$, 时间×组别差异: $F=0.351$, $P=0.834$)和平均游离距离(组间差异: $F=41.583$, $P=0.000$; 时间差异: $F=1.837$, $P=0.260$; 时间×组别差异: $F=0.082$, $P=0.984$)。但其在不同测试天数的差距并无统计学意义,且在空间探索实验中,APP/PS1/LC3 三转基因小鼠穿越

平台的次数明显减少 (2.000 ± 0.707 vs. 4.800 ± 0.800 , $t=2.622$, $P=0.031$)。见图 2。

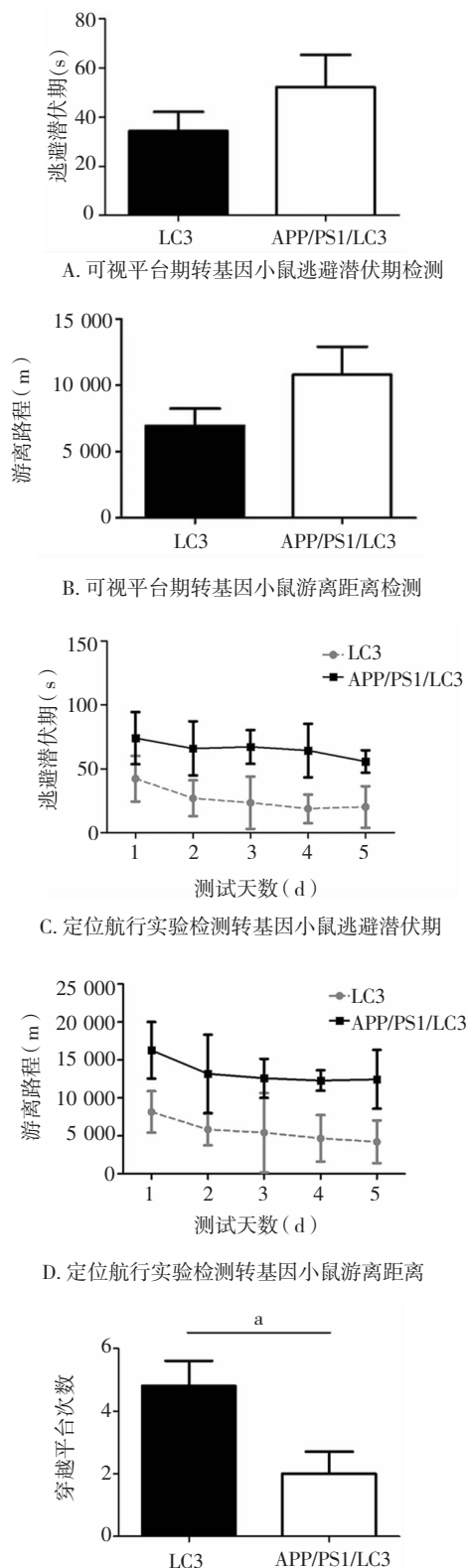


图 2 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠认知学习记忆能力比较

2.3 自噬小体的观察

透射电镜观察显示,与同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠相比,6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑神经元内出现数量较多的自噬小体。见图 3。

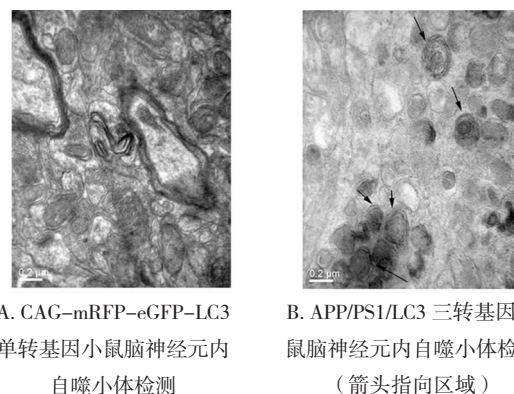


图 3 透射电镜观察 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑内自噬小体数量

2.4 自噬体和自噬溶酶体的检测

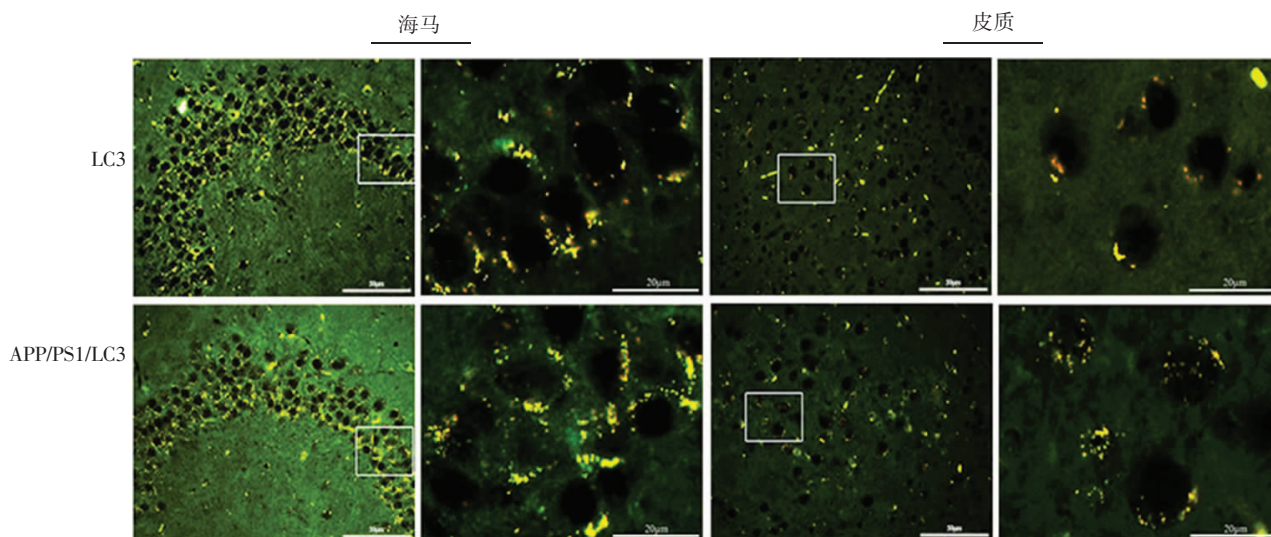
荧光显微镜下观察,APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑海马区 GFP 荧光斑点和 mRFP 荧光斑点均多于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠海马区 (14.820 ± 0.967 vs. 5.894 ± 0.214 , $t=0.017$, $P=0.000$; 16.660 ± 0.944 vs. 7.097 ± 0.300 , $t=9.668$, $P=0.000$),脑皮质区内 GFP 荧光斑点和 mRFP 荧光斑点亦多于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠 (10.030 ± 1.265 vs. 1.943 ± 0.120 , $t=6.364$, $P=0.000$; 10.760 ± 1.281 vs. 2.505 ± 0.131 , $t=6.412$, $P=0.000$)。APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑海马区自噬体及自噬溶酶体数量均明显高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠海马区 (14.820 ± 3.350 vs. 5.894 ± 0.742 , $t=0.017$, $P=0.000$; 1.840 ± 0.559 vs. 1.204 ± 0.420 , $t=3.156$, $P=0.005$),脑皮质内自噬体数量亦均高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑皮质 (1.943 ± 0.415 vs. 10.030 ± 4.382 , $t=6.364$, $P=0.000$),但自噬溶酶体数量比较,差异无统计学意义 (0.562 ± 0.207 vs. 0.686 ± 0.195 , $t=0.156$, $P=0.878$)。见图 4。

2.5 老年斑的形成情况

免疫组织化学结果显示,6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内可见明显老年斑,而同月龄同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑内未见老年斑。见图 5。

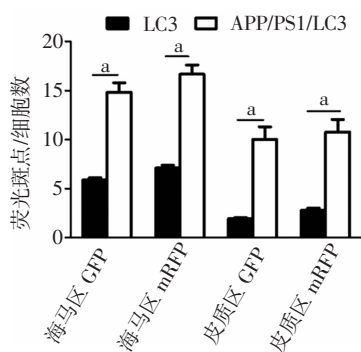
2.6 自噬相关蛋白的检测

Western blot 检测显示 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内 $A\beta$ 前体蛋白 APP 的表达明显高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠 (0.690 ± 0.275 vs. 0.294 ± 0.070 , $t=3.423$, $P=0.007$)。作为自噬发生的标记物,LC3II/I 在 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内的表达也明显高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因野生型小鼠 (0.534 ± 0.019 vs. 0.241 ± 0.004 , $t=37.170$, $P=0.000$)。作为重要的自噬调控因子,Beclin1

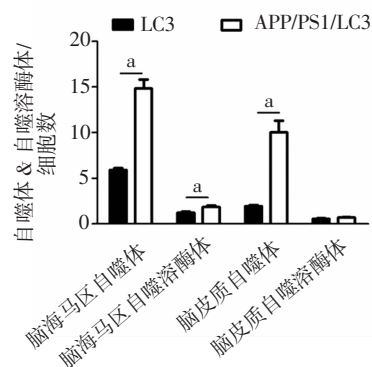


每组图中,右图为左图方框标识区域放大图

A. 转基因小鼠荧光斑点比较

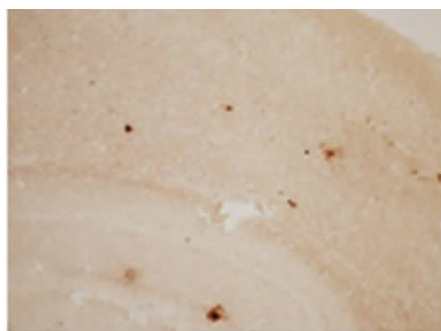
a: 与 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠比较, $P=0.000$

B. 脑海马区及脑皮质的 GFP 与 mRFP 荧光统计图

a: 与 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠比较, $P<0.01$

C. 脑海马区及脑皮质自噬体及自噬溶酶体统计图

图 4 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠自噬流情况



A. APP/PS1/LC3 三转基因小鼠



B. CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠

图 5 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑内老年斑沉积情况(400 ×)

在 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内的表达水平明显高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠 (1.180 ± 0.255 vs. 0.479 ± 0.020 , $t=6.820$, $P=0.000$)。溶酶体降解的底物 P62 在 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内检的表达也明显升高

(0.356 ± 0.021 vs. 0.188 ± 0.007 , $t=18.850$, $P=0.000$)。APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内溶酶体膜蛋白 LAMP1 的表达水平相较 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠降低 (0.773 ± 0.043 vs. 1.450 ± 0.065 , $t=8.705$, $P=0.000$)。见图 6。

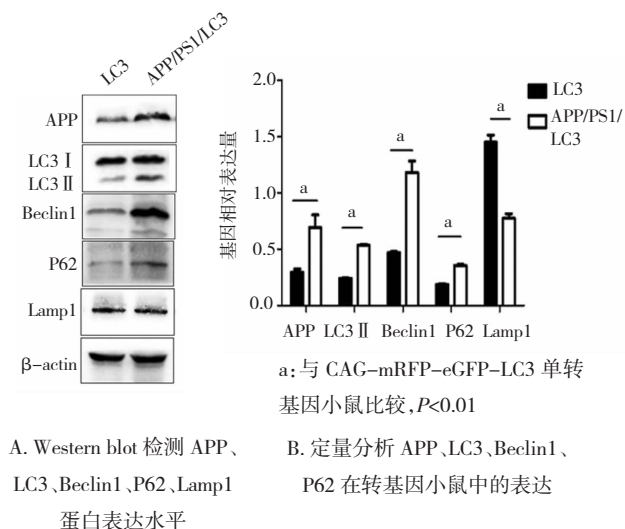


图 6 Western blot 显示 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠和同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠脑内 AD 和自噬相关蛋白表达情况

3 讨论

细胞外 β -淀粉样蛋白沉积形成老年斑、细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结以及突触和神经元的丢失是 AD 患者脑内的典型病理特征^[2]。越来越多的证据表明,自噬作为清除细胞内异常蛋白、细胞器及维持细胞稳态的细胞卫士,在 AD 的发生发展中起到关键的调控作用。AD 患者脑中存在大量的自噬体和自噬溶酶体。自噬溶酶体的增加一方面是由于自噬激活,另一方面则是由于自噬底物的清除缺陷引起^[5]。在 AD 发病早期,激活自噬可加速变性蛋白的清除,促进神经元存活。随着 AD 的进展,蛋白质聚积物越来越多,自噬功能下降, $A\beta$ 和 Tau 蛋白的清除减少,最终可诱导凋亡或引发自噬性细胞死亡,加剧 AD 患者脑内神经元的丢失^[7-8]。因此,在研究自噬在 AD 中的作用时,动态监测自噬流过程尤为重要。

自噬流过程可分为 4 个阶段^[9-10]。一是自噬的诱导发生:自噬的发生受机体发育阶段和细胞营养条件的影响。丰富营养条件可抑制非特异性自噬的发生;而在应激条件下,如饥饿、生长因子缺乏或能量需求增加时,细胞自噬会迅速启动,作为产生必需大分子和能量的来源,并清除细胞内变构成分。细胞接收到信号刺激,内质网无核糖体部分膜脱落,形成一个由脂质双分子层构成的“口袋”样结构,称

为隔离膜。隔离膜在被降解物周围形成,不断扁平扩张,称为自噬泡。二是自噬体的形成:隔离膜逐渐延伸,将细胞内需降解的细胞器、蛋白质揽入“口袋”中,形成直径 300~900 nm 的双层膜结构,称自噬体。自噬体的形成是自噬发生的典型特征,是自噬的核心部分。三是自噬体与溶酶体融合:自噬体形成后,通过细胞骨架微管系统传输,自噬体将其包裹物运输至溶酶体,自噬泡的外膜与溶酶体膜结合,内膜及其包裹的物质进入溶酶体腔。这种吞噬了细胞内成分的溶酶体具有单层膜结构,称自噬溶酶体^[7]。四是自噬溶酶体的降解:自噬体与溶酶体融合后,自噬体的内膜及其内容物被溶酶体酶降解,降解成分部分被循环利用,部分排出细胞或沉积在胞浆中。溶酶体内多种蛋白水解酶参与自噬降解过程^[12]。最后自噬体膜脱落再循环利用,部分自噬产物如氨基酸、脂肪酸等输送到细胞质中供细胞重新利用。

APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠是目前探讨 AD 发病机制及药物靶点的较为理想的动物模型。由于 AD 发病主要病理变化是 $A\beta$ 沉积形成老年斑,而 $A\beta$ 主要由 APP 经 β -分泌酶和 γ -分泌酶先后切割产生。APP/PS1 双突变转基因小鼠出生后 2~3 个月可溶性 $A\beta$ 增加;5~6 个月出现老年斑沉积,并出现行为学异常;9~10 个月老年斑大量增加。CAG-mRFP-eGFP-LC3 转基因小鼠具有双荧光自噬指示体系,可进行自噬体溶酶体运输测定。自噬形成时,GFP-mRFP-LC3 融合蛋白聚集到自噬体膜,在荧光显微镜下形成黄色荧光斑点,即自噬体。由于 GFP 是酸敏感型蛋白,自噬体与溶酶体融合后,溶酶体内部的酸性环境可导致 GFP 淬灭,而 mRFP 是稳定的荧光表达基团,受 pH 影响较小。因此可以通过 GFP 与 mRFP 的亮点比例来评价自噬流进程。本研究创新性地用 APP695swe/PS1-D9 双突变转基因种鼠与 CAG-mRFP-eGFP-LC3 转基因种鼠杂交,构建了 APP/PS1+CAG-mRFP-eGFP-LC3 多转基因 AD 自噬流模型小鼠,使得 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑内的 LC3 蛋白获得 CAG-mRFP-eGFP 双荧光标记。自带双荧光指示系统的小鼠可取脑切片后直接镜下观察自噬体及自噬溶酶体的形成情况,无须经过染色等过程,更能便捷、准确、动态反映出 AD 病理条件下自噬流水平的变化。6 月龄的 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠认知学习记忆

功能相比较同月龄的 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠有明显下降,表明 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠仍具有出 AD 模型鼠认知功能障碍的特点。6 月龄的 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内开始出现明显老年斑,透射电镜显示其脑内双层膜结构的自噬小体明显增多,表明 AD 病理条件下自噬的激活。荧光结果显示其脑内自噬体比同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠有显著增加,但自噬溶酶体并未成比例升高,且 GFP 与 mRFP 的亮点比例升高,即自噬溶酶体在自噬小体中所占比例降低,说明 AD 小鼠脑内自噬激活并且有自噬体与自噬溶酶体融合障碍。Beclin 是自噬调控的一个关键因子,是自噬体形成不可或缺的条件^[13]。Western blot 检测证实 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内 Beclin1 明显高于同窝 CAG-mRFP-eGFP-LC3 单转基因小鼠,表明自噬在 AD 鼠脑内受到激活。P62 蛋白是溶酶体降解的底物之一,自噬发生且自噬流畅通时,P62 水平下降,而当自噬活动受到阻碍时,P62 则不断累积^[14]。在 6 月龄 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠脑内检测到高水平的 P62 表达,表明在自噬流存在阻滞,自噬体内包裹的内容物不能顺利被溶酶体降解。Lamp1 是溶酶体膜蛋白,其数量的高低与溶酶体的数量及完整性正相关。自噬是细胞内的成分在溶酶体内进行降解的过程^[15-18],其主要形式可分为巨自噬(通常所说的自噬)、微自噬、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。在 CMA 中,胞质蛋白的特定子集直接迁移穿过溶酶体膜进入溶酶体腔^[19],此过程需依赖于 Lamp 蛋白。之前已有研究表明 CMA 的功能障碍存在于许多神经退行性疾病中^[20-21],在 APP/PS1/LC3 三转基因小鼠中,Lamp1 表达水平降低,表明在 AD 中,CMA 或许亦存在功能缺损。自噬体与溶酶体融合障碍以及自噬溶酶体功能障碍或许是晚期 AD 中,自噬的发生反而加剧 AD 病情进展的原因。本研究结果表明,APP/PS1/LC3 多转基因小鼠既能模拟 AD 的病理特征,又能动态监测自噬流情况,可以作为研究 AD 自噬流功能的一种理想的动物模型。

参 考 文 献

[1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease[J]. Dis Mon, 2010, 56(9):484-546.

[2] Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. Cell, 2012, 148(6):1204-1222.

[3] Matus S, Valenzuela V, Hetz C. A new method to measure autophagy flux in the nervous system[J]. Autophagy, 2014, 10(4):710-714.

[4] Castillo K, Valenzuela V, Matus S, et al. Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo[J]. Cell Death Dis, 2013, 4:e917.

[5] Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease A β peptide[J]. Bioessays, 2014, 36(6):570-578.

[6] Qian L, Yi L, Miao S. Autophagy and Alzheimer's disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(3):377-388.

[7] Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative diseases[J]. Nat Med, 2013, 19(8):983-997.

[8] Zare-Shahabadi A, Masliah E, Johnson GV, et al. Autophagy in Alzheimer's disease[J]. Rev Neurosci, 2015, 26(4):385-395.

[9] Yang J, Carra S, Zhu WG, et al. The regulation of the autophagic network and its implications for human disease[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(10):1121-1133.

[10] Wang Y, Qin ZH. Coordination of autophagy with other cellular activities[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(5):585-594.

[11] Zheng L, Cedazo-Minguez A, Hallbeck M, et al. Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system[J]. Transl Neurodegener, 2012, 1(1):19.

[12] Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al. Two beclin 1-binding proteins, Atg14L and rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(4):385-396.

[13] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62[J]. Cell, 2009, 137(6):1062-1075.

[14] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182):1069-1075.

[15] Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 335:1-32.

[16] Zhu XC, Yu JT, Jiang T, et al. Autophagy modulation for Alzheimer's disease therapy[J]. Mol Neurobiol, 2013, 48(3):702-714.

[17] Tan CC, Yu JT, Tan MS, et al. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(5):941-957.

[18] Arias E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2):184-189.

[19] Sooparb S, Price SR, Shaoguang J, et al. Suppression of chaperone-mediated autophagy in the renal cortex during acute diabetes mellitus[J]. Kidney Int, 2004, 65(6):2135-2144.

[20] Venugopal B, Mesires NT, Kennedy JC, et al. Chaperone-mediated autophagy is defective in mucopolidosis type IV[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2):344-353.

(责任编辑:张辉洁)